

**Avaliação da segurança da
introdução de *Pseudomonas
putida* no ambiente: testes
ecotoxicológicos da Fase 1 e
perspectivas de implementação
de novos estudos**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 60

Avaliação da segurança da introdução de *Pseudomonas putida* no ambiente: testes ecotoxicológicos da Fase 1 e perspectivas de implementação de novos estudos

Claudio Martín Jonsson

Vera Lúcia S. S. de Castro

Célia Maria M. Silva

Aline de Holanda Nunes Maia

Embrapa Meio Ambiente

Jaguariúna, SP

2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 Km 127,5 - Tanquinho Velho

Caixa Postal 69

CEP 13820-000 Jaguariúna, SP

Fone: (19) 3311-2650

Fax: (19) 3311-2640

<http://www.cnpma.embrapa.br>

sac@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Marcelo Augusto Boechat Morandi*

Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*

Membro Nato: *Adriana M. M. Pires*

Membros: *Lauro Charlet Pereira, Fagoni Fayer Calegario, Aline de Holanda Nunes Maia, Nilce Chaves Gattaz, Marco Antonio Ferreira Gomes e Rita Carla Boeira*

Normalização bibliográfica: *Victor Paulo Marques Simão*

Editoração eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*

1ª edição eletrônica (2011)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente**

Avaliação da segurança da introdução de *Pseudomonas putida* no ambiente: testes ecotoxicológicos da Fase 1 e perspectivas de implementação de novos estudos / Claudio Martín Jonsson; Vera Lúcia S.S. de Castro; Célia Maria M. Silva; Aline de Holanda Nunes Maia. – Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2011.

28 p.— (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente; 60).

1. Controle biológico. 2. Bactéria. 3. Toxidez. 4. Teste ecotoxicológico. 5. Daphnia. 6. Roedor. I. Jonsson, Claudio Martin. II. Castro, Vera Lúcia S. S. III. Silva, Célia Maria M. IV. Maia, Aline de Holanda Nunes. V. Série. VI. Título.

CDD 571.95

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	7
Introdução.....	8
Materiais e Métodos	11
Produção de <i>P. putida</i>	11
Testes com microcrustaceos e roedores (Fase 1)	12
Efeito de <i>P. putida</i> AF7 sobre microrganismos do solo e avaliação da atividade enzimática	13
Resultados	15
Invertebrados aquáticos	15
Mamíferos	17
Microrganismos do solo.....	17
Discussão	19
Organismo não-alvo.....	19
Perspectivas de implementação de estudos com microrganismos do solo ..	21
Agradecimentos	23
Referências	24

Avaliação da segurança da introdução de *Pseudomonas putida* no ambiente: testes ecotoxicológicos da Fase 1 e perspectivas de implementação de novos estudos

*Claudio Martín Jonsson*¹

*Vera Lúcia S.S. de Castro*²

*Célia Maria M. Silva*³

*Aline de Holanda Nunes Maia*⁴

Resumo

Os procedimentos de avaliação de risco necessários para a liberação de agentes microbianos em campo são executados de acordo com protocolos em fases sequenciais nas quais estão incluídos os estudos em organismos não-alvo. A bactéria *Pseudomonas putida* - linhagem AF7- (*P. putida* AF7) tem demonstrado potencial de aplicação no meio ambiente, tanto como biorremediador, como no controle de pragas. No presente estudo foram avaliados alguns efeitos desta bactéria em roedores (ratos Wistar) e organismos aquáticos (*Daphnia similis*) que constam da Fase inicial dos protocolos. Também foi avaliada a atividade enzimática microbiana em três tipos de solo após a sua inoculação com o agente biológico. Os ratos não demonstraram

¹Farmacêutico, Doutor em Biologia Funcional e Molecular, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP.

jonsson@cnpma.embrapa.br

²Veterinária, PhD, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340 - Km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP.

castro@cnpma.embrapa.br

³Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP.

celia@cnpma.embrapa.br

⁴Engenheira Agrônoma, Doutora em Agronomia, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000, Jaguariúna, SP.

ahmaia@cnpma.embrapa.br

sintomas de patogenicidade, apesar do agente biológico ter sido recuperado em homogeneizados de pulmão após 16 horas de exposição. *P. putida* não alterou significativamente a sobrevivência de *D. similis* durante 21 dias, nem diminuiu a sua reprodução. As atividades enzimáticas (fosfatase ácida, protease e β -glucosidase) dos solos analisados apresentaram valores que oscilaram para mais e para menos, após a inoculação da bactéria. Apesar de não constar dos atuais protocolos de avaliação, a medida de alterações nas características bioquímicas do solo é apresentada como uma via alternativa para a avaliação dos efeitos do agente biológico a ser introduzido no ambiente. Esta inserção seria feita na primeira fase da análise de risco aplicado a ecossistemas tropicais.

Palavras-chave: controle biológico, toxicidade, ratos Wistar, *Daphnia*, solo, enzima, biorremediação

Safety evaluation of the introduction of *Pseudomonas putida* in the environment: ecotoxicity tests of Tier 1 and perspectives on implementation of new studies

Abstract

The evaluation of the exposure effects on non-target organisms is a mandatory procedure before the release of microbial agents in the field. It is performed with non-target organisms in a tiered sequence according to the risk assessment guidelines. The bacteria *Pseudomonas putida* – strain AF7- (*P. putida* AF7) is a promising organism for the agriculture that has been investigated as a bioremediator and as a pest control agent. The effects of this bacteria in rodents (Wistar rats) and in aquatic organisms (*Daphnia similis*) were investigated. The enzymatic activity of microorganisms belonging to three types of soils was also evaluated after the inoculation with *P. putida* AF7. Although it was detected the presence of the biological agent in lung homogenates after rat exposure for 16 hours, clinical alterations were not detected. *Daphnia* reproduction and survival (21 days) were not significantly reduced. Acid phosphatase, protease and β -glucosidase activities in the soil showed a fluctuation pattern that was noted after the bacteria inoculation. An alternative way to assess the biological agent effects is proposed with basis in changes in soil biochemical properties. This would be feasible at the first level procedures in risk assessment applied to tropical ecosystems.

Key Words: biological control, toxicity, Wistar rats, *Daphnia*, soil, enzyme, bioremediation.

Introdução

É de amplo conhecimento que o uso extensivo de insumos agrícolas nos agroecossistemas pode levar a desequilíbrios nos ecossistemas de entorno. Isto é extremamente relevante em países em desenvolvimento como o Brasil, em que a economia é, em grande parte, dependente de atividades agrícolas. Assim, como resultado do crescente interesse na conservação dos recursos naturais, vem crescendo consideravelmente o interesse pela utilização de alternativas economicamente mais viáveis e menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. Neste contexto, o uso de agentes microbianos de controle de pragas tem provado ser uma prática efetiva e apropriada para tais fins. Um exemplo disto é o uso de esporos de *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos (EILENBERG et al., 2001). Embora a grande maioria dos microrganismos utilizados como biopesticidas sejam considerados seguros, os agentes microbianos de controle biológico podem, potencialmente, perturbar as comunidades ecológicas mesmo de forma transitória (BAKKER et al., 2002). A capacidade de sobrevivência, persistência, multiplicação, disseminação, e manifestação de patogenicidade e toxicidade estão envolvidas no risco de que um microrganismo pode apresentar para o ambiente. Assim sendo, a análise de risco do uso desses agentes envolve a realização de estudos laboratoriais antes de seu registro e comercialização. Os testes toxicológicos, como parte da avaliação de risco de biopesticidas, visam fornecer previsões suficientemente precisas de efeitos adversos na saúde humana e ao meio ambiente de modo a oferecer subsídios para o manejo do risco. Estes estudos são baseados em protocolos realizados em uma sequência de fases em diferentes níveis (ESTADOS UNIDOS, 1996a, b). Apesar do grande número de fatores que podem alterar a interação agente biológico – hospedeiro, acredita-se que, na maioria dos casos, dados dos testes da primeira fase (Fase 1) possam contribuir para uma avaliação criteriosa dos riscos potenciais. A Fase 1 consiste em avaliar os efeitos de uma dose de máximo risco de exposição. Dada à alta concentração de AMC utilizada na Fase I, supõe-se que esta seja suficiente para ocasionar efeito adverso no organismo não-alvo se o agente possuir potencial de ocasionar

infecção, ou se ocorrer a presença da toxina. Assim, o risco ambiental pode ser determinado através de abordagens com base no “pior caso”, utilizando-se uma dose do agente biológico em estudo como sendo 100-1000 vezes maior que a recomendada a campo (dose-desafio).

Os testes em organismos aquáticos não-alvo são realizados com a microalga cloroficea *Pseudokirchneriella subcapitata*; o microcrustaceo *Daphnia similis* e peixes da família Characidae, respectivamente, são escolhidos como representantes de diferentes níveis tróficos (BRASIL, 1988). Os organismos não-alvo são examinados periodicamente para avaliar a mortalidade, reprodução ou quaisquer outros efeitos adversos observáveis (ESTADOS UNIDOS, 1996b).

Para os estudos sobre a segurança da saúde humana, são usados roedores, tais como ratos Wistar. Os testes iniciais dos protocolos são projetados para detectar efeitos como alergenicidade, toxicidade, infectividade e patogenicidade (CASTRO et al, 1999; ESTADOS UNIDOS, 1996a). Na Fase 1, os animais são observados diariamente para a verificação de alterações clínicas e lesões nos órgãos através da necropsia, em diferentes intervalos após a administração do agente biológico. É recomendável testar uma dose de, pelo menos, 10^8 unidades do agente microbiano por animal teste. Esta é considerada a dose-desafio para mamíferos.

A expressão da presença de um microorganismo pode resultar na sua inserção e propagação continuada em um novo habitat. A determinação dos efeitos de um agente microbiano quando é introduzido em um novo ambiente inclui uma avaliação de seu crescimento - a forma como o agente microbiano pode alterar seus hábitos de crescimento, aproveitar novas condições ambientais ou de tirar vantagem das mudanças no equilíbrio existente entre as espécies microbianas. Em 1997, a Embrapa adaptou as diretrizes para avaliação de risco do biopesticida com base em protocolos internacionais, que foram aprovadas na legislação brasileira (JONSSON; MAIA, 1999; CASTRO et al., 1999).

Antes do registro destes agentes microbianos, os dados da Fase 1 devem ser examinados, sendo que a obtenção de dados referentes à expressão no meio ambiente (Fase 2) pode ser necessária na dependência do resultado obtido e devem se basear na análise “caso a caso” para os microorganismos.

A avaliação do efeito de microrganismos exóticos (microrganismos não naturais do habitat em que estão presentes), introduzidos no solo, não está incluída na Fase 1 dos protocolos de regulamentação. Os estudos da Fase 2 são realizados para determinar se o agente microbiano é capaz de sobreviver, se manter e se reproduzir num dado compartimento ambiental. Alguns parâmetros como temperatura, umidade, precipitação, luz, pH e nutrientes devem ser avaliados para determinar seu efeito sobre a sobrevivência e o crescimento da população do agente microbiano. Se os resultados destes estudos indicarem que o microorganismo é capaz de persistir e se multiplicar no compartimento em questão, então são realizados os testes da Fase 3. Nos estudos desta terceira fase são avaliados e quantificados os riscos de exposição associados à situações mais próximas da realidade. Nestas, leva-se em consideração, entre outros fatores, a susceptibilidade de diferentes espécies de organismos não-alvo, assim como a exposição às concentrações dos agentes biológicos resultantes da aplicação de dose recomendada a campo.

As espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* têm uma grande variedade de aplicações, pois mostram potencial de uso na degradação de uma ampla variedade de xenobióticos (WALIA et al., 2002) e influenciam a rizosfera no crescimento das plantas (JOHANSEN et al., 2005). *Pseudomonas* também podem ser usadas como um biopesticida no tratamento da podridão-parda em frutíferas (ALTINDAG et al., 2006). *Pseudomonas putida* é uma bactéria de solo que tem potencial para uso em processos bioquímicos, como a produção de compostos naturais, a biorremediação de numerosos compostos em ambientes poluídos, bem como a utilização de cepas de controle de doenças de plantas (SCHNEIDER; DORN, 2001).

A Instrução Normativa Conjunta nº. 3 de 10 de março de 2006 foi promulgada considerando a necessidade de estabelecer norma específica para fins de registro de produtos microbiológicos que se caracterizem como produtos técnicos, agrotóxicos e afins, com base na experimentação em sequência de Fases.

Embora as restrições de recursos dificultem a realização de programas de execução de testes para todos os biopesticidas, estudos básicos são necessários para obter a melhor evidência científica possível e, em consequência, subsidiar a avaliação de seus possíveis riscos. Para isso, métodos são necessários para determinar possíveis efeitos em organismos não-alvo, especialmente em países de agricultura tropical que apresentam boas condições ambientais para os agentes microbianos e que possuem uma rica biodiversidade.

De modo a fornecer um panorama sobre metodologias de avaliação de efeitos de biopesticidas, no presente trabalho, serão abordados alguns estudos de Fase 1 realizados com *P. putida*, que será utilizada para fins de exemplificação.

Nesta abordagem, serão discutidos os resultados obtidos nesse nível de avaliação e, também, as perspectivas para a introdução de novos estudos nos protocolos experimentais; neste caso, os efeitos nas comunidades microbianas do solo, pelo fato de desempenharem importantes funções, tais como ciclagem de nutrientes e decomposição da matéria orgânica.

Materiais e Métodos

Produção de *P. putida*

P. putida AF7 foi originalmente isolada da rizosfera de arroz, cultivada em solos historicamente expostos ao herbicida propanil em Massaranduba, Santa Catarina, Brasil. O isolado foi inicialmente repicado, ficando armazenado em BOD até aguardar seu crescimento. Na fase exponencial,

18 h após o semeio em placa, o isolado foi centrifugado por 15 min em 5000 g, lavado em solução tampão fosfato (pH 7,0) e ressuspenso no tampão.

A cepa foi previamente caracterizada pela análise de metil ésteres de ácidos graxos. Em todos os experimentos *P. putida* AF7 foi cultivada em meio King B por 24 h a 30°C. Através do uso da alça de platina, em tubos de 9 mL, foram preparadas suspensões em solução salina esterilizada (0,85 %) de modo a se obter a concentração de 10^8 ufc (unidades formadoras de colônias) por mililitro. A obtenção desta concentração se fez pelo ajuste da medida da absorbância nos 550nm (0,1 de absorbância = 10^8 ufc mL⁻¹). As suspensões salinas foram utilizadas para a realização dos estudos de exposição em mamíferos. Do mesmo modo, foram preparadas as suspensões nas exposições dos organismos aquáticos e estudos com organismos do solo, sendo utilizada água reconstituída e água destilada, respectivamente.

Testes com microcrustaceos e roedores (Fase 1)

O cladócero *Daphnia similis* foi testado como organismo não-alvo. Este foi cultivado em água reconstituída preparada de acordo com Hosokawa et al. (1991) e Elendt e Bias (1990), em temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade ~ 2.000 lux. O número inicial de neonatos (menos de 24 horas de idade) em cada unidade experimental (500 ml de volume final) foi equivalente a 12 indivíduos. Os tratamentos, avaliados em cinco repetições, foram: controle (sem *P. putida* AF7), *P. putida* AF7 inativada (10^6 ufc mL⁻¹ autoclavados a 121°C por 20 min) e *P. putida* AF7 ativa (10^6 ufc mL⁻¹). As suspensões do agente microbiano foram renovadas em períodos de 48, 96 e 168 horas em cada semana durante o tempo total de exposição de 21 dias. Para cada renovação, novas suspensões contendo 10^8 ufc mL⁻¹ foram preparadas para a obter as concentrações descritas nos tratamentos. Antes de cada renovação do meio foram retiradas amostras para avaliar o número de neonatos produzidos por dia (NNPD) por cada adulto e a taxa de sobrevivência ao final do período de exposição. As médias de NNPD foram comparadas pelo teste F para contrastes (MONTGOMERY, 1991). As taxas de sobrevivência, ou seja, as proporções de sobreviventes (%) de um tratamento acompanhado por determinado período, foram comparadas pelo teste de Wald (STOKES et al., 2000).

Os efeitos da *P. putida* AF7 foram investigados em ratos a fim de se avaliar possíveis efeitos toxicopatológicos promovidos pela exposição às bactérias por via oral. Ratos Wistar (machos e fêmeas nulíparas), com idade de 90 dias e pesando 230 ± 15 g (média \pm erro padrão) foram alojados em gaiolas de polycarbonato com cama de maravalha de madeira. Foram alimentados “*ad libitum*” com ração (Purina Lab Chow) e água potável da rede de abastecimento. Os animais foram mantidos em sala climatizada com temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade de 70% e fotoperíodo 12h luz/12 h escuro. As matrizes foram adquiridas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Foram expostos três animais em cada ponto e utilizados três tratamentos para cada via: bactéria ativa, bactéria inativada e o veículo de administração da bactéria, como controle.

Uma dose de 10^8 ufc de *P. putida* AF7 foi administrada por gavagem a cada animal e um exame clínico cuidadoso foi realizado diariamente em todos os animais. Este consistiu de observações da pele e pelos, olho e mucosas e sistemas respiratório, circulatório, nervoso; além da avaliação comportamental. A necropsia dos animais foi realizada após 3, 16 e 24 h de exposição. Os intervalos de exposição foram determinados através de testes preliminares

Para a quantificação do agente biológico, homogeneizados de tecidos (rins, pulmão, mesentério e fígado) e sangue foram diluídos (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}), plaqueados em meio King B com propanil e incubados para a contagem do número de colônias. A confirmação de dados taxonômicos da bactéria foi realizada pelo procedimento de análise de ácidos graxos em cromatografia gasosa (CASTRO; MELO, 2007) demonstrando 98% de similaridade.

Efeito de *P. putida* AF7 sobre microrganismos do solo e avaliação da atividade enzimática

As condições experimentais foram concebidas para a criação de condições ambientais controladas que se assemelhem a uma situação de campo. Os solos utilizados foram provenientes da Fazenda Experimental da Embrapa Meio Ambiente. Para cada tipo de solo selecionado: Latossolo vermelho escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA), foram retiradas dez sub-amostras ao acaso, à

profundidade de 0-10cm, as quais foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma amostra composta para cada solo. Em laboratório as amostras foram peneiradas em malha de 2mm e mantidas em câmara fria a 4°C até sua utilização. Dez sub-amostras de cada solo foram colhidas aleatoriamente e coletadas de 0 a 10 cm de profundidade. No laboratório, as amostras foram homogeneizadas e sub-homogeneizadas para constituir uma amostra composta, que foi seca, peneirada e armazenada a 4°C. As características do solo foram: C orgânico total (%) = 2,87 - 80,4; N total (mg / kg) = 879-1952; teor de argila (%) = 21,5 - 44; pH = 4,0-4,8; matéria orgânica (%) = 2,0 - 4,93 e P (mg / kg) = 7,20-13,40. A capacidade de troca de cátions (CTC, mmol / dm³) variou entre 51,1 e 93,2, e a Capacidade de Retenção de Água (CRA, %) entre 19,7-28,9 (SILVA et al., 2009). Antes da adição da bactéria nas unidades experimentais, o solo permaneceu em Erlenmeyers por 7 dias a 27°C, já com umidade corrigida para 70% WHC. O regime de luz foi fixado em fotoperíodo de 12 h luz / 12 horas escuro.

Duas concentrações de *P. putida* AF7 foram aplicadas ao solo: 3.5×10^4 ufc g⁻¹ de matéria seca e 3.5×10^5 ufc g⁻¹ de matéria seca. A umidade do solo foi mantida em nível normal com a aplicação de água deionizada. Amostras de solo, sem inoculação, foram utilizadas como controle. Aos 7, 14 e 21 dias após a incubação, foram retiradas amostras para avaliar as atividades das enzimas β-glucosidase, fosfatase ácida e da protease em três repetições para cada tratamento.

As atividades da fosfatase ácida (ALEF et al., 1995) β-glucosidase (ALEF; NANNIPIERI, 1995a) e protease (ALEF; NANNIPIERI, 1995b) foram determinadas conforme métodos já descritos. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste F para contrastes foi realizada para quantificar os efeitos da concentração do agente biológico nos diferentes tipos de solo e tempo de exposição.

Resultados

Invertebrados aquáticos

Um aumento significativo ($p < 0,05$) no NNPD foi observado para ambos os tratamentos que continham *P. putida* AF7 inativada ou ativa. Apesar de que houve uma redução de 12% de sobrevivência de *D. similis* exposta ao microrganismo ativo em relação ao controle, nenhuma evidência forte ($p = 0,179$) foi encontrada a respeito da influência da bactéria na mortalidade do microcrustáceo (Tabela 1). A variação dos parâmetros de reprodução e mortalidade em função do tempo estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

Tabela 1: Reprodução e sobrevivência de *D. similis* após 21 dias de exposição a *P. putida* AF7.

Efeito na reprodução				Efeito na sobrevivência		
		Valores P para contrastes*		Valores P para contrastes**		
	NNPD ^a	bactéria inativada	bactéria ativa	sobrevivência (%) ^b	bactéria inativada	bactéria ativa
controle	2.17	0,0268	0,0289	70,00	0,8408	0,1794
bactéria inativada	3.11		0,9673	71,76		0,1220
bactéria ativa	3.10			58,33		

^a Número de neonatos produzidos por dia (NNPD) por cada adulto (média de cinco réplicas correspondentes a todos os intervalos para cada tratamento).

^b Média de cinco réplicas correspondentes ao final do teste.

* Níveis de significância gerados pelo teste F para contrastes entre as médias de tratamentos (Controle x *P. putida* AF7 inativada; Controle x *P. putida* AF7 ativa e *P. putida* AF7 inativada x *P. putida* AF7 ativa).

** Níveis de significância gerados pelo teste de Wald para contrastes entre as médias de tratamentos (Controle x *P. putida* AF7 inativada; Controle x *P. putida* AF7 ativa e *P. putida* AF7 inativada x *P. putida* AF7 ativa).

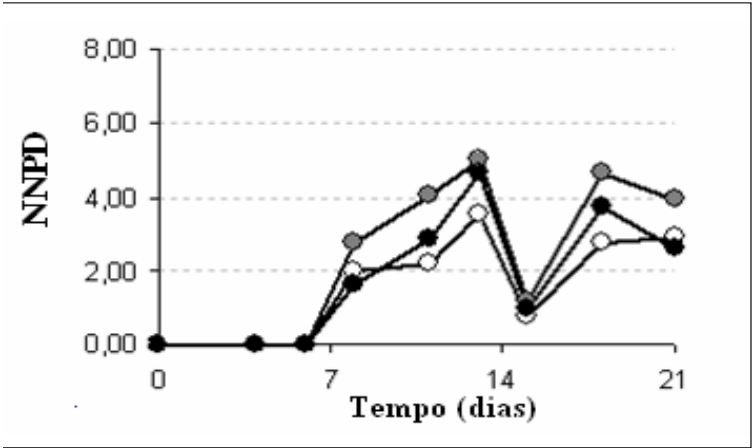


Figura 1. Variação temporal da taxa de reprodução de *D. similis* sob exposição a *P. putida* AF7 durante 21 dias: (○) controle; (●) *P. putida* AF7 inativada e (◐) *P. putida* AF7 ativa. (n=5)

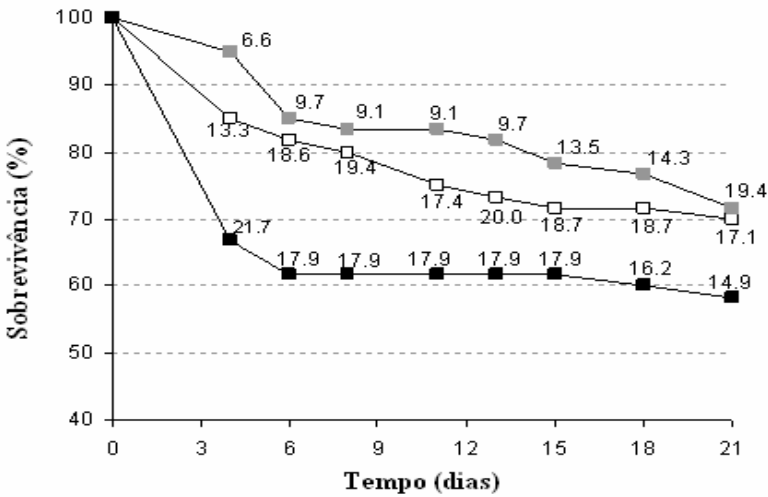


Figura 2. Curvas de sobrevivência de *D. similis* em função do tempo, decorrentes da exposição a *P. putida* AF7 durante 21 dias: (□) controle; (■) *P. putida* AF7 inativada e (◼) *P. putida* AF7 ativa. Os valores nos pontos representam o desvio padrão (d.p.) para cinco réplicas.

Mamíferos

Os animais foram observados diariamente, e não apresentaram alterações clínicas em quaisquer dos intervalos analisados após a exposição. Nenhuma colônia foi recuperada de órgãos e tecidos dos animais sacrificados nos intervalos de 3 e 24h. As colônias bacterianas foram encontradas em homogeneizados de pulmão após 16h de exposição. A contagem de bactérias nesse tecido foi equivalente a $3,31 \times 10^4$ ufc g⁻¹.

Microrganismos do solo

Em geral, as atividades enzimáticas apresentaram variação entre os solos testados (Tabelas 2, 3 e 4). As maiores atividades da β -glucosidase e fosfatase ácida foram observadas nos solos LVE e AVA, comparativamente ao solo LVA. Este tipo de solo manifestou maior atividade de protease.

No solo LVE foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) da atividade da β -glucosidase para a exposição a 3.5×10^4 ufc g⁻¹ peso seco após 7 dias e a 3.5×10^5 ufc g⁻¹ peso seco após 14 dias, comparativamente ao controle.

Entretanto, no solo AVA, a atividade da enzima aumentou após 7 e 14 dias da inoculação, respectivamente, para a exposição a 3.5×10^5 e 3.5×10^4 ufc g⁻¹ peso seco. Neste solo, houve um decréscimo da atividade da fosfatase ácida de até 10% no 14^o e 21^o dia após a data de inoculação. A maior atividade enzimática foi detectada nesse mesmo solo, variando de 310-359 μ g de *p*-nitrofenol g⁻¹ solo h⁻¹.

Não há evidência significativa ($p > 0,08$) associada a uma variação temporal da atividade da fosfatase ácida nos solos LVE e LVA. Para o solo AVA esta atividade se alterou em função do tempo ($p < 0,05$) para a menor concentração de *P. putida* AF7. A disponibilidade de nutrientes foi semelhante nos tratamentos com o agente biológico e controles.

A atividade da protease demonstrou correlação positiva com C orgânico ($r = 0,65$; $p < 0,05$) e correlação negativa com a concentração de N ($r = -0,64$; $p < 0,05$). Para a atividade da β -glucosidase, C orgânico e

P demonstraram correlação positiva ($r = 0,66$; $p < 0,05$) e negativa ($r = -0,74$; $p < 0,05$), respectivamente. Por outro lado, a atividade da fosfatase ácida não demonstrou correlação para estes dois parâmetros ($p > 0,84$) (SILVA et al., 2009).

Tabela 2. Efeito de três tratamentos com *P. putida* AF7 na atividade da fosfatase ácida \pm d.p. ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g}^{-1}$ solo h^{-1}) de diferentes solos ($n=3$).

Solo ^a	Dias	<i>P. putida</i> (ufc mL^{-1})		
		0	$3,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$
LVE	7	251.7 \pm 11.5	268.4 \pm 22.6	261.1 \pm 19.7
	14	244.4 \pm 2.7	238.5 \pm 3.4	255.2 \pm 8.2
	21	245 \pm 2.9	264.2 \pm 14	246.9 \pm 6.6
LVA	7	140.2 \pm 27.9	147.4 \pm 11	152.4 \pm 1.9
	14	108.9 \pm 6.8	130 \pm 2.5	121.2 \pm 14.7
	21	218.6 \pm 28.9	224.6 \pm 13.8	235.3 \pm 53.5
AVA	7	324.6 \pm 21.3	335 \pm 14.6	337.6 \pm 21.8
	14	359.2 \pm 27.7	326.7 \pm 27.8*	353.8 \pm 8.7
	21	343.6 \pm 20.5	310.9 \pm 10*	354.5 \pm 12.8

^aLatossolo vermelho-escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA)

*Evidência de efeito (não significativa).

Tabela 3. Efeito de três tratamentos com *P. putida* AF7 na atividade da protease + d.p. (μg tirosina g^{-1} solo h^{-1}) de diferentes solos ($n=3$).

Solo ^a	Dias	<i>P. putida</i> (ufc mL^{-1})		
		0	$3,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$
LVE	7	145.5 \pm 21.1	196.4 \pm 94	196.9 \pm 100.1
	14	100.4 \pm 8	199.1 \pm 9.4	110.5 \pm 35.2
	21	68.2 \pm 0.7	69.8 \pm 13.8	82.9 \pm 6.5
LVA	7	201.6 \pm 6.6	179.6 \pm 7.7	267.6 \pm 102.5
	14	227.5 \pm 27.3	228.1 \pm 15.7	230.4 \pm 25.1
	21	163.9 \pm 21.2	181.5 \pm 26.6	177.6 \pm 29.5
AVA	7	140.4 \pm 56.2	135 \pm 11.6	122.7 \pm 30.8
	14	167.1 \pm 45.4	139.1 \pm 28.6	169.2 \pm 4.1
	21	128.3 \pm 79.6	113 \pm 14.6	123.1 \pm 29.4

^aLatossolo vermelho-escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA)..

Tabela 4. Efeito de três tratamentos com *P. putida* AF7 na atividade da β -glucosidase \pm d.p. ($\mu\text{g g}^{-1}$ *p*-nitrofenol. solo⁻¹) de diferentes solos (n=3).

Solo ^a	Dias	<i>P. putida</i> (ufc mL ⁻¹)		
		0	3,5 x10 ⁴	3,5 x 10 ⁵
LVE	7	53.7±16.7	39.5±11.0**	50.2±5.3
	14	63.2±10.9	77.8±8.2	28.5±6.0**
	21	104±17.8	78.3±2.6*	91.2±9.5
LVA	7	39.7±3.0	37.8±2.8	39.8±1.8
	14	39±2.1	42.5±3.0	39.3±2.5
	21	50.7±2.7	56.1±9.3	53.7±5.0
AVA	7	24±3.8	36.8±4.4	52±0.1**
	14	58.7±12.2	74.5±6.8**	43±0.3
	21	48.5±6.0	43.5±3.8	41.9±3.0

^aLatossolo vermelho-escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA).

*Evidência de efeito (não significativa).

**Efeito significativo (p<0,05).

Discussão

Organismos não-alvo

No presente trabalho a presença de colônias de *P. putida* AF7 não foi detectada após as 24 horas de administração. Portanto, poder-se-ia supor que este agente biológico é rapidamente eliminado do organismo de mamíferos. Com base nestes resultados, não haveria evidências de infectividade nos tecidos analisados. Tais fatos são consistentes com as observações clínicas nos animais, que demonstraram ausência de sintomas associados a algum dano.

A recuperação da bactéria do tecido pulmonar foi, provavelmente, devido à contaminação na exposição oral, apesar dos procedimentos de desinfecção realizados durante o estudo. Pode-se também supor que a recuperação da bactéria nos pulmões poderia ser decorrente de sua capacidade de infecção, mesmo sem a presença de lesões e/ou doença e sem persistir no organismo. A translocação do agente biológico para outros tecidos é outra hipótese, sendo provável que isto tenha ocorrido via linfonodos mesentéricos a partir da exposição oral. A translocação

de cepas de *Pseudomonas* para o fígado e baço de camundongos foi observada após 3 horas e até 120 horas da administração (GEORGE et al., 1990). Mesmo, em uma concentração bem menor do que a dose inicial, colônias da cepa AC869 de *P. aeruginosa* foram recuperadas de pulmões de ratos 2 e 7 dias após uma dose-desafio por via oral (GEORGE et al. 1996). Com base nas observações em mamíferos, parâmetros como a rota primária de exposição, a concentração do agente em estudo, assim como os efeitos evidentes ou indiretos, devem ser considerados antes da liberação de *Pseudomonas* em campo. Assim é que os protocolos nacionais e internacionais recomendam a realização de testes por diversas vias de exposição, além da oral como a pulmonar, entre outras.

Informações sobre riscos ambientais devido ao uso de agentes microbianos em longo prazo são difíceis de obter. Apesar de *P. putida* parecer não causar efeitos deletérios em invertebrados não-alvos como insetos (SCHNEIDER; DORN, 2001), a literatura especializada relata algumas infecções causadas por esses organismos em peixes. Assim, o exame histopatológico do tecido infectado mostrou a ocorrência de peritonite macrofágica multifocal em vários órgãos, assim como necrose dérmica (SMOLOWITZ et al., 1998). De acordo com os autores, a presença de *Pseudomonas sp.* é normal nos compartimentos aquáticos, mas tendem a causar efeitos adversos em situações de estresse. Entretanto, raramente tem sido identificada como agente causal de patogenias no habitat natural.

Com relação aos organismos zooplancctônicos, infecções bacterianas foram observadas em outras espécies de *Daphnia*, como a promovida por *Pasteuria ramosa*, que no caso, alterou os níveis de C, N, e P (FROST et al., 2008). Uma toxicidade moderada para *Daphnia sp.* foi atribuída a algumas cepas de *B. thuringiensis* (ESTADOS UNIDOS, 1998). Este biopesticida pode também afetar adversamente algumas espécies de mexilhões (GORMLY et al., 1996).

Em vista dos resultados obtidos neste trabalho, e com base em que os cladóceros são organismos filtradores de material particulado, além

de bactérias e fungos, sugere-se que *P. putida* AF7 desempenhou uma função nutricional que incrementou a fertilização.

Em geral, os resultados de estudos com biopesticidas têm indicado que os protocolos comumente usados têm providenciado informação prática necessária para a análise de risco. Neste contexto, os fundamentos e dados provenientes destes protocolos podem ser interpretados como uma medida de probabilidade de um efeito adverso ser ocasionado para uma dada exposição. No entanto, este paradigma não cobre algumas lacunas devido a uma ausência de diretrizes legais de como fazer o balanço entre os riscos e os benefícios do controle biológico associado ao uso de agentes microbianos. Algumas abordagens novas de testes são desejáveis para atender melhor a avaliação de risco dos organismos-alvo, uma vez que os ecossistemas são ambientes complexos que apresentam diversas interações entre fatores bióticos e abióticos.

Perspectivas de implementação de estudos com microrganismos do solo

A capacidade de um biopesticida se propagar em ambientes contendo organismos não-alvo é um tema preocupante. O solo é um habitat extremamente complexo dentro da biosfera, sendo os microrganismos seres vivos que dominam nas comunidades e desempenham importantes funções nos ecossistemas, tais como ciclagem de nutrientes e decomposição. Por isso, o compartimento solo é foco de grande preocupação relacionada aos efeitos potenciais de agentes de biocontrole. Assim, têm sido observadas perturbações transitórias em populações autóctones de bactérias (NATCH et al., 1997), fungos (SHORT et al., 1990; GLANDORF et al., 2001) e protozoários (AUSTIN et al., 1990).

Os níveis de atividade enzimática obtidos resultaram na percepção de respostas microbiológicas a mudanças de condições ambientais (CORSTANJE et al., 2007). Por exemplo, a flutuação de valores de atividade enzimática obtida após a inoculação de *P. putida* AF7 poderia ser atribuída a desequilíbrios que levam à substituição por populações que produzem essas enzimas. Outro possível efeito decorrente da

inoculação de *P. putida* AF7 poderia ser atribuído ao efeito direto na atividade metabólica do microrganismo não-alvo (KEEL et al., 1992).

Os resultados obtidos a partir dos estudos enzimáticos sugerem que o tratamento com o agente biológico tem um impacto significativo na ciclagem de C num curto prazo, afetando a biodisponibilidade deste elemento. A forte correlação positiva entre a atividade de β -glucosidase e carbono orgânico confirmam esta observação, sendo que resultados semelhantes foram encontrados por Landgraf e Klose (2002) e Mawdsley e Burns (1994). Estes autores demonstraram que os níveis de galactosidase e glucosidase se alteraram como resultado da presença de *Flavobacterium* sp. no solo.

No presente trabalho, a adição de *P. putida* AF7 causou efeito significativo na atividade da β -glucosidase, a qual foi reduzida, indicando que a presença desse agente biológico causa menor demanda pelo C, com uma redução da disponibilidade de C orgânico.

Os altos níveis de atividade fosfatásica observados no solo AVA, em comparação aos outros tipos de solo, foram devido à predominância de fosfato solúvel neste solo.

Do mesmo modo, Johansen et al. (2005) evidenciaram os efeitos de *Pseudomonas fluorescens* DR54 sobre organismos não-alvo da microbiota de solo e rizosfera. Após introdução deste agente no solo através de sementes e inoculação, constatou-se o deslocamento de *Pseudomonas* autóctones.

Há dificuldade de se recomendar técnicas específicas que possam detectar perturbações indesejáveis na microbiota do solo sob várias condições devido à grande diversidade genética e funcional dos microrganismos. Entretanto, com base nos resultados obtidos, a avaliação da atividade enzimática parece ser uma ferramenta promissora no monitoramento de efeitos em microrganismos não-alvo da microbiota, juntamente com outros métodos. Este tipo de avaliação tem recebido pequena atenção com relação à investigação

de efeitos de inóculos de agentes biológicos em solos (SILVA et al. 2009). Com base nestes argumentos, dados de supostos impactos sobre microrganismos do solo podem representar um passo importante no aprimoramento das bases científicas na análise de risco. O tipo de estudo aqui apresentado poderia ser incluído entre os procedimentos da Fase 1 citado na avaliação de risco em regiões tropicais, já que a temperatura desempenha uma importante função no decaimento de matéria orgânica nas diferentes frações do solo. Este fato estaria associado à sensibilidade relativa da atividade das várias enzimas, que é dependente da temperatura (KOCH et al., 2007). Assim sendo, tais ensaios poderiam ser requeridos caso a caso após prévia revisão pelas agências regulatórias, dependendo das suas características, tal como a persistência ambiental.

Agradecimentos

Ao Dr. Itamar Soares de Melo do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente por, gentilmente, ter nos fornecido a cepa da bactéria.

Referências

- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. β -glucosidase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995a. p. 350-352.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Protease activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995b. p. 313-315.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P.; TRAZAR-CEPEDA, C. Phosphatase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 335-344.
- ALTINDAG, M.; SAHIN, M.; ESITKEN, A.; ERCISLI, S.; GULERYUZ, M.; DONMEZ, M. F.; SAHIN, F. Biological control of brown rot (*Moniliana laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hachihaliloglu) by *Bacillus Burkholdria*, Orlando, v. 38, p. 369-372, 2006.
- AUSTIN, H. K.; HARTEL, P. G.; COLEMAN, D. C. Effects of genetically altered *Pseudomonas solanacearum* on predatory protozoa. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, p. 115-117, 1990
- BAKKER, P.; GLANDORF, D.; VIEBAHN, M.; OUWENS, T.; SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K.; THOMASHOW, L.; THOMAS-OATES, J.; VAN LOON, L. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4- diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat, **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81 , p. 617-624, 2002.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Secretaria Especial do Meio Ambiente. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília, DF: SEMA/MHU, 1988. 351 p.
- CASTRO, V.; CAPALBO, D.; MORAES, G.; NARDO, E.; OLIVEIRA, M. **Protocolos de avaliação de agentes microbianos de pragas para registro como biopesticidas – testes toxicopatológicos em mamíferos**, vol.

2. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 40 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 10).

CASTRO, V.; MELO, I. Toxicopathological evaluation of rats exposed to *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v. 2, p. 1-5, 2007.

CORSTANJE, R.; REDDY, K. R.; PRENGER, J. P.; NEWMAN, S.; OGRAM, A. V. Soil microbial eco-physiological response to nutrient enrichment in a sub-tropical wetland. **Ecological Indicators**, Kiel, v. 7, p. 277-289, 2007.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, Dordrecht, v. 46, p. 387-400, 2001.

ELENDT, B. P.; BIAS, W. R. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. **Water Research**, New York, v. 24, p. 1152-1167, 1990.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Bacillus thuringiensis Subspecies israelensis Strain**. EG2215 (006476) Fact Sheet. Washington, DC. Disponível em: <http://www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006476.htm>. Acesso em: 5 nov. 2010.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Microbial pesticide test guidelines**: OPPTS 885.3000 Background -Mammalian toxicity/Pathogenicity/Infectivity. Washington, DC, 1996a. 6 p. (EPA712-C-96-314).

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Microbial pesticide test guidelines**: OPPTS 885.4000 Background for Nontarget Organism Testing of Microbial Pest Control Agents. Washington, DC, 1996b. 25 p. (EPA712-C-96-328).

FROST, P. C.; EBERT, D.; SMITH, V. H. Bacterial infection changes the elemental composition of *Daphnia magna*. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 77, p. 1265-1272, 2008.

GEORGE, E.; KOHAN, M.; NELSON, G.; SCHLUNDT, J. Determination of potential health effects in the mouse comparing intranasal and peroral exposure to *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Microbial Ecology in Health and Disease**, Oslo, v. 9, p. 143-156, 1996.

GEORGE, E.; KOHAN, M.; WHITEHOUSE, D.; CREASON, J.; CLAXTON, L. Influence of antibiotics on intestinal tract survival and translocation of environmental *Pseudomonas* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 56, p. 1559-1564, 1990.

GLANDORF, D.; VERHEGGEN, P.; JANSEN, T.; JORRITSMA, J.; SMIT, E.; LEEFLANG, P.; WERNARS, K.; THOMASHOW, L.; LAUREIJS, E.; THOMAS-OATES, J.; BAKKER, P.; VAN LOON, L. Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WC358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 67, p. 3371-3378, 2001.

GORMLY, N. M.; SINGER, S.; GENTHNER, F. J. Nontarget testing of microbial pest control agents using larvae of the coot clam *Mulinia lateralis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Victoria, v. 26, p. 229-235, 1996.

HOSOKAWA, M.; ENDO, G.; KURODA, K.; HORIGUCHI, S. Influence of sulfate, Ca and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia similis*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, Lake Alfred, v. 46, p. 461-465, 1991

JOHANSEN, A.; KNUDSEN, I.; BINNERUP, S.; WINDING, A.; JOHANSEN, J.; JENSEN, L.; ANDERSEN, K.; SVENNING, M.; BONDE, T. Non-target effects of the microbial control agents *Pseudomonas fluorescens* DR54 and *clonostachys rosea* IK726 in soils cropped with barley followed by sugar beet, a greenhouse assessment. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, p. 2225-2239, 2005.

JONSSON, C. M.; MAIA, A. H. N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. Testes toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente aquático:** organismos zooplancônicos, fitoplancônicos e vertebrados. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 33 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 11).

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Supression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolic 2,4- diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, p. 4-13, 1992.

KOCH, O.; TSCHERKO, D.; KANDELER, E. Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, D.C., v. 21, GB4017, p. 1-11, 2007.

LANDGRAF, D.; KLOSE, S. Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 165, p. 9-16, 2002.

MAWDSLEY, J. L.; BURNS, R. G. Inoculation of plants with *Flavobacterium* species results in altered rhizosphere enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 871-882. 1994.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 3. ed. New York: John Wiley, 1991. p. 672.

NATCH, A.; KEEL, C.; HEBECKER, N.; LAASIK, E.; DÉFAGO, G. Influence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and its antibiotic overproducing derivative on the diversity of resident root colonizing *Pseudomonads*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 23, p. 341-352, 1997.

SCHNEIDER, M.; DORN, A. Differential infectivity of two *Pseudomonas* species and the immune response in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Insecta, Hemiptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 78, p. 135-140, 2001.

SHORT, K.; SEIDLER, R.; OLSEN, R. Survival and degradative capacity of *Pseudomonas putida* induced constitutively expressing plasmid mediated degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate (TFD) in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 821-826, 1990.

SILVA, C.; CASTRO, V.; OLIVEIRA, P.; MAIA, A. Influence of *Pseudomonas putida* AF7 inoculation on soil enzymes. **Ecotoxicology**, Oak Ridge, v. 18, p. 1182-1187, 2009.

SMOLOWITZ, R.; WADMAN, E.; CHIKARMANE, H. M.. *Pseudomonas putida* infections of the oyster toadfish (*Opsanus tau*). **The Biological Bulletin**, Fairfax, v. 195, p. 229-231, 1998.

STOKES, M. E.; DAVIS, C. S.; KOCH, G. G. **Categorical data analysis using the SAS System**. 2. ed. Cary: SAS Institute Inc., 2000.

WALIA, S.; ALI-SADAT, S.; BRAR, R.; CHAUDHRY, G. Identification and mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* OU83. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 73, p. 131-139, 2002.



Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

